

УДК 57.086.13

## ВАРИАБЕЛЬНЫЙ САЙТ CTCF ИЗ ИНТРОНА ГЕНА *UBX* *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЯВЛЯЕТСЯ ИЗБЫТОЧНЫМ И НЕ ИМЕЕТ ИНСУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2022 г. А. Н. Ибрагимов<sup>1,\*</sup>, О. В. Былино<sup>1</sup>, О. В. Кырчанова<sup>1</sup>, Ю. В. Шидловский<sup>1</sup>, R. White<sup>2</sup>,  
P. Schedl<sup>3</sup>, академик РАН П. Г. Георгиев<sup>1</sup>

Поступило 30.04.2022 г.

После доработки 09.05.2022 г.

Принято к публикации 09.05.2022 г.

CTCF является наиболее изученным и консервативным архитектурным белком хроматина, который был найден у дрозофилы и млекопитающих. CTCF преимущественно связывается с промоторами и инсуляторами и может участвовать в формировании хроматиновых петель. В группе сайтов, названных вариабельными, связывание CTCF зависит от эпигенетического статуса окружающего хроматина. Так, вариабельный сайт CTCF (*vCTCF*), обнаруженный в интроне гена *Ubx*, находится в непосредственной близости к энхансерам *BRE*, *abx*. CTCF связывается с вариабельным сайтом только в тканях, в которых ген *Ubx* активен, что дало основание предполагать роль *vCTCF* в формировании контактов между *Ubx* промотором и энхансерами *BRE*, *abx*. С помощью метода CRISPR/Cas9 и *attP/attB* сайт-специфической интеграции мы исследовали функциональную роль *vCTCF* и показали, что его отсутствие не приводит к дефектам развития. Также фрагмент 2161 п.н., содержащий *vCTCF*, не является эффективным инсулятором на месте границы *Fab-7* локуса *VX-C*. Таким образом, *vCTCF* имеет избыточные функции в регуляции экспрессии *Ubx*.

**Ключевые слова:** инсуляторы, CTCF, *Vithorax* complex, *Ubx*

**DOI:** 10.31857/S2686738922040060

Парасегмент-специфичная экспрессия трех гомеозисных генов *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* комплекса *Vithorax* (*VX-C*) *Drosophila melanogaster* регулируется девятью автономными регуляторными доменами, которые разделены специальными регуляторными элементами, названными границами [1]. Границы обеспечивают автономность путем блокировки контактов между регуляторными элементами из соседних доменов. Кроме того, границы также могут предотвращать взаимодействие энхансеров с промотором [2–4]. Помимо инсуляторной активности границы обладают способностью специфично взаимодействовать с целевыми генами *VX-C*, позволяя энхансерам, расположенным в регуляторных доменах, стимулировать соответствующие промоторы [5]. Эти свойства границ обеспечивают правильную экс-

прессию *VX-C* генов в соответствующих парасегментах и определенные временные интервалы развития дрозофилы. Так, было показано, что границы *Fab-6*, *Fab-7* и *Fab-8* специфично взаимодействуют с предпромоторной областью *Abd-B*, чем, вероятно, и обуславливают правильное позиционирование соответствующих доменов (*iab5–iab7*) в парасегментах 10–12 [6].

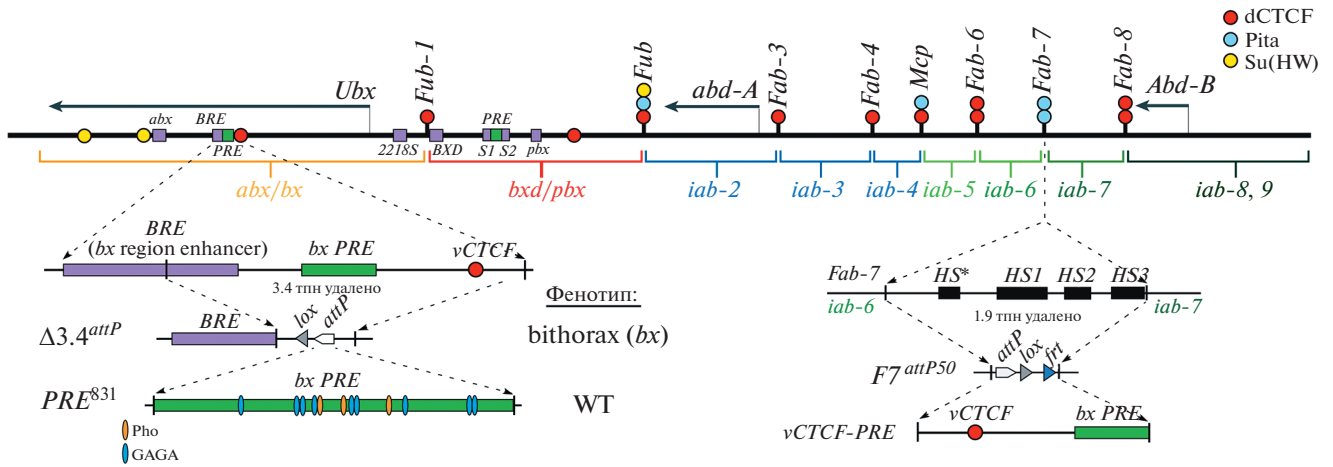
Большая часть границ регуляторных доменов *VX-C* содержат сайты связывания для дрозофилиного гомолога белка CTCF (*dCTCF*), которые определяют инсуляторную активность границ (рис. 1) [7]. В интроне гена *Ubx* был обнаружен вариабельный сайт связывания *dCTCF* (*vCTCF*), который находится на расстоянии 30 тпн ниже промотора (рис. 1) [8]. *dCTCF* не связывается с этим сайтом в тканях, в которых *Ubx* неактивен (имагинальные диски первой пары ног), но связывается с ним в транскрипционно активном локусе *Ubx* (имагинальные диски третьей пары ног). Было показано, что связывание *dCTCF* с *vCTCF* сайтом сопряжено с изменениями в топологии *abx/bx* регуляторного домена: в тканях, в которых *Ubx* активен, наблюдается увеличение частоты контактов *vCTCF* сайта с промотором *Ubx* [8]. Была предложена модель, в соответствии с которой

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Кембриджский университет, Кембридж, Великобритания

<sup>3</sup> Принстонский университет, Принстон, США

\*e-mail: airat.ibra@gmail.com



**Рис. 1.** Схема организации генов и регуляторных доменов в ВХ-С. Показаны *abx/bx*, *bxd/pbx* и *iab-2 – iab-8* домены, ответственные за регуляцию генов *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* и за развитие парасегментов 5–13/сегментов Т3–А8. Эмбриональные энхансеры *Ubx* представлены в виде фиолетовых прямоугольников. Поперечные линии с цветными кружками обозначают границы. Сайты связывания изоляторных белков dCTCF, Pita и Su(Hw) на границах обозначены красными, голубым и желтыми кружками. В нижней части рисунка изображены схемы регуляторного района, содержащего варибельный сайт dCTCF и границы *Fab-7*, а также их делеции. Для *Fab-7* сайты гиперчувствительности *HS\**, *HS1*, *HS2*, *HS3* изображены как черные прямоугольники на линии координат. Сайт гиперчувствительности *bx PRE* изображен как зеленый прямоугольник, а сайты для белков Pho и GAGA-фактора как оранжевые и синие овалы. Сайты *attP*, *lox* и *ftr*, использованные для генетических манипуляций, обозначены как белые, серые и синие треугольники.

связывание dCTCF с *vCTCF* стимулирует тканеспецифичное взаимодействие энхансеров *abx* и *BRE* с промотором [9, 10]. Целью данной работы была проверка этой гипотезы.

Для изучения функции *vCTCF* сайта в энхансер-промоторных взаимодействиях с помощью метода CRISPR/Cas9 мы создали платформу  $\Delta 3.4^{attP}$ , в которой фрагмент размером 3408 пн (3R:16701239..16704646), включающий в себя *vCTCF* сайт и *bx PRE* (polycomb response element) (рис. 1), был удален и замещен сайтом *attP*. Мы показали, что делеция имеет слабый варибельный фенотип потери функции (loss-of-function, LOF). Этот фенотип имеет название *bithorax (bx)* и выражается в частичной трансформации Т3 сегмента в Т2 [11, 12]. Так, у полученных нами мух на третьей паре ног появляется щетинка, характерная для второй пары, также у них часто наблюдается увеличение А1 сегмента, а у ~10% мух между Т3 и А1 сегментами образуется метанотальная ткань (рис. 2).

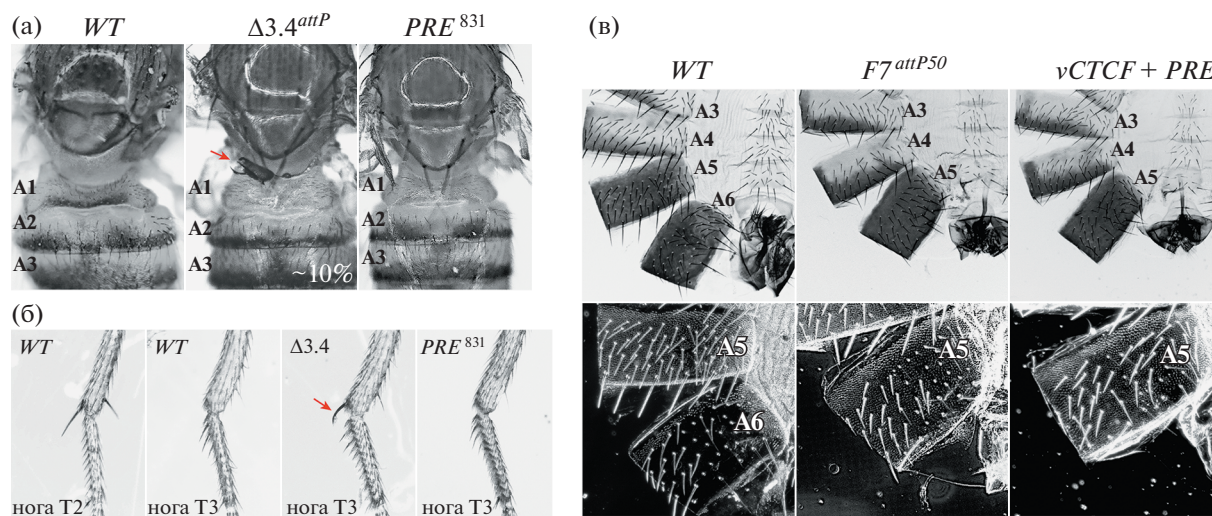
Данные трансформации объясняются нарушением взаимодействия энхансеров, находящихся ниже варибельного сайта dCTCF, с промотором *Ubx*. Полученная делеция  $\Delta 3.4^{attP}$  перекрывается с описанной ранее делецией *bx<sup>34e-prv</sup>* размером 9.5 тпн, которая так же имеет варибельный *bx* фенотип, вызванный уменьшением экспрессии *Ubx* в имгинальных дисках Т3 сегмента [11].

Далее мы использовали описанную выше линию  $\Delta 3.4^{attP}$  в качестве платформы для поиска минимального элемента, который бы спасал му-

тантный фенотип. Мы провели *attP-attB* зависимую интеграцию фрагмента *bx PRE* размером 831 пн (*PRE<sup>831</sup>*, 3R:16702487..16703317) в линию  $\Delta 3.4^{attP}$  и обнаружили, что он полностью восстанавливает *bx* фенотип до дикого типа. Это свидетельствует о том, что данный элемент способствует взаимодействию энхансеров с промотором *Ubx*, в то время как варибельный сайт dCTCF является избыточным.

Для того чтобы проверить, имеет ли варибельный сайт dCTCF инсуляторную активность, мы провели его интеграцию в платформу *Fab-7<sup>attP50</sup>* (рис. 1). В данной платформе удалена граница *Fab-7*, в результате чего регуляторные домены *iab-6* и *iab-7* сливаются, и происходит преждевременная активация *iab-7*, что приводит к лизису шестого сегмента у самцов [13–15]. Ранее было показано, что PRE часто располагаются в непосредственной близости от изоляторов и вносят вклад в формирование функциональной границы [16, 17]. Поэтому для тестирования был использован фрагмент содержащего в себе *bx PRE* и варибельный сайт dCTCF в обратной ориентации — *vCTCF+PRE* (2161 п.н., 3R:16702487..16704647). У самцов полученной линии мух полностью отсутствовал шестой сегмент, что свидетельствует об отсутствии у *vCTCF+PRE* инсуляторной активности.

Таким образом, полученные данные не подтверждают модель, согласно которой *vCTCF* является необходимым медиатором энхансер-промоторных взаимодействий в домене *abx/bx*. Более



**Рис. 2.** (а) Сравнение фенотипов тергитов сегментов Т3–А1 мух дикого типа (*wt*),  $\Delta 3.4^{attP}$  и  $PRE^{831}$ .  $\Delta 3.4^{attP}$  имеет вариабельный фенотип, ~10% мух имеют увеличенный А1 сегмент. Красная стрелка указывает на очаг формирования мезанотальной ткани. Интеграция  $PRE^{831}$  восстанавливает мутантный фенотип до дикого типа. (б) Сравнение фенотипов ног Т3 сегмента мух *wt*,  $\Delta 3.4^{attP}$  и  $PRE^{831}$ . У мух дикого типа на паре ног Т2 сегмента имеется пара длинных щетинок, которые отсутствуют на паре ног сегмента Т3. У мух линии  $\Delta 3.4^{attP}$  на Т3 ноге развивается одна длинная щетинка (отмечена красной стрелкой), что свидетельствует о частичной трансформации в Т2. У мух  $PRE^{831}$  она не развивается. (в) Снимки кутикулы абдоминальных сегментов самцов линий *wt*,  $Fab-7^{attP50}$ ,  $vCTCF+PRE$  в светлом и темном поле. У самцов *wt* сегмент А7 отсутствует, стернит А6 изогнутый и лишен щетинок, а стернит А5 прямоугольный и покрыт щетинками. Тергит А5 полностью покрыт трихомами, а А6 покрыт ими только по переднему и вентральному краям (см. темное поле). У самцов  $Fab-7^{attP50}$  из-за слияния регуляторных доменов *iab-6* и *iab-7* сегмент А6 трансформируется в А7 (не развивается). У самцов  $vCTCF+PRE$  А6 сегмент так же не развивается.

того, данные указывают, что эту роль, вероятно, выполняет *bx PRE*. Дальнейшие исследования необходимы для изучения функции *bx PRE*. Поскольку потеря *bx PRE* приводит лишь к слабому фенотипу потери функции, можно предположить, что, в отличие от регуляторных доменов гена *Abd-B*, энхансеры *Ubx* гораздо более автономны и в меньшей степени зависят от других регуляторных элементов при формировании контакта с промотором.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантами Российского научного фонда. CRISPR/Cas9 мутагенез и *attP/attB* сайт-специфическая интеграция были выполнены при поддержке гранта 20-14-00201. Анализ фенотипов выполнен из средств гранта 19-74-30026.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maeda R.K., Karch F. The open for business model of the bithorax complex in *Drosophila* // *Chromosoma*. V. 124. № 3. P. 293–307, Sep. 2015.
2. Özdemir I., Gambetta M.C. The Role of Insulation in Patterning Gene Expression // *Genes (Basel)*. 2019. V. 10. № 10. P. 767.
3. Valenzuela L., Kamakaka R.T. Chromatin Insulators // *Annual Review of Genetics*. 2006. V. 40. № 1. P. 107–138.
4. West A.G., Gaszner M., Felsenfeld G. Insulators: many functions, many mechanisms // *Genes Dev*. 2002. V. 16. № 3. P. 271–288.
5. Kyrchanova O. et al. The boundary paradox in the Bithorax complex // *Mechanisms of Development*. 2015. V. 138. P. 122–132.
6. Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. Selective interactions of boundaries with upstream region of *Abd-B* promoter in *Drosophila* bithorax complex and role of dCTCF in this process // *Nucleic Acids Res*. 2011. V. 39. № 8. P. 3042–3052.
7. Bowman S.K. et al. H3K27 modifications define segmental regulatory domains in the *Drosophila* bithorax complex // *eLife*. 2014. V. 3. P. e02833.
8. Magbanua J.P., Runneburger E., Russell S., White R. A Variably Occupied CTCF Binding Site in the Ultra-bithorax Gene in the *Drosophila* Bithorax Complex // *Mol Cell Biol*. 2015. V. 35. № 1. P. 318–330.
9. Qian S., Capovilla M., Pirrotta V. The *bx* region enhancer, a distant cis-control element of the *Drosophila* *Ubx* gene and its regulation by hunchback and other segmentation genes. // *EMBO J*. 1991. V. 10. № 6. P. 1415–1425.
10. Simon J., Peifer M., Bender W., O'Connor M. Regulatory elements of the bithorax complex that control expres-

- sion along the anterior-posterior axis // EMBO J. 1990. V. 9. № 12. P. 3945–3956.
11. Peifer M., Bender W. The anterobithorax and bithorax mutations of the bithorax complex. // EMBO J. 1986. V. 5. № 9. P. 2293–2303.
  12. Bender W. et al. Molecular Genetics of the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster* // Science. 1983. V. 221. № 4605. P. 23–29.
  13. Hagstrom K., Muller M., Schedl P. Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. // Genes Dev. 1996. V. 10. № 24. P. 3202–3215.
  14. Mihaly J. et al. Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex // Cell Mol Life Sci. 1998. V. 54. № 1. P. 60–70.
  15. Mateo L.J., Murphy S.E., Hafner A., Cinquini I.S., Walker C.A., Boettiger A.N. Visualizing DNA folding and RNA in embryos at single-cell resolution // Nature. 2019. V. 568. № 7750. P. 49–54.
  16. Kyrchanova O. et al. The insulator functions of the *Drosophila* polydactyl C2H2 zinc finger protein CTCF: Necessity versus sufficiency // Sci Adv. 2020. V. 6. № 13. P. eaaz3152.
  17. Mihaly J., Hogga I., Gausz J., Gyurkovics H., Karch F. In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element // Development. 1997. V. 124. № 9. P. 1809–1820.

## THE VARIABLE CTCF SITE FROM *DROSOPHILA MELANOGASTER* *UBX* GENE IS REDUNDANT AND HAS NO INSULATOR ACTIVITY

A. N. Ibragimov<sup>a,#</sup>, O. V. Bylino<sup>a</sup>, O. V. Kyrchanova<sup>a</sup>, Y. V. Shidlovskii<sup>a</sup>, R. White<sup>b</sup>, P. Schedl<sup>c</sup>, and Academician of the RAS P. G. Georgiev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

<sup>c</sup> Princeton University, Princeton, USA

#e-mail: [airat.ibra@gmail.com](mailto:airat.ibra@gmail.com)

CTCF is the most thoroughly studied chromatin architectural protein and it is found in both *Drosophila* and mammals. CTCF preferentially binds to promoters and insulators and is thought to facilitate formation of chromatin loops. In a subset of sites, CTCF binding depends on the epigenetic status of the surrounding chromatin. One such variable CTCF site (*vCTCF*) was found in the intron of the *Ubx* gene, in close proximity to the *BRE* and *abx* enhancers. CTCF binds to the variable site in tissues where *Ubx* gene is active, suggesting that the *vCTCF* site plays a role in facilitating contacts between the *Ubx* promoter and its enhancers. Using CRISPR/Cas9 and *attP/attB* site-specific integration methods, we investigated the functional role of *vCTCF* and showed that it is not required for normal *Drosophila* development. Furthermore, a 2161-bp fragment containing *vCTCF* does not function as an effective insulator when substituted for the *Fab-7* boundary in the Bithorax complex. Our results suggest that *vCTCF* function is redundant in the regulation of *Ubx*.

**Keywords:** insulators, CTCF, Bithorax complex, *Ubx*